

## Tetrazoliumvegyületek fényreakciói

### I. A diszproporcionálódási reakció

JÁMBOR BÉLA

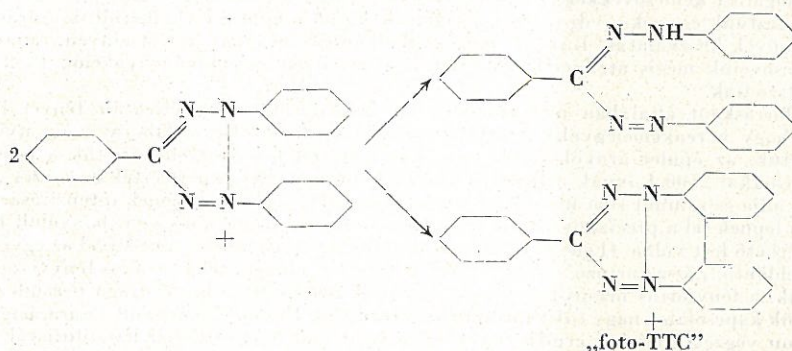
*Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest*

Már Pechmann és Runge, a trifeniltetrazoliumklorid (TTC) első előállítói [11], s azóta mások is [2, 3, 4, 5, 10, 12] felhívták a figyelmet e vegyület és egyes származékainak fényérzékenységére. Egyesek [10, 12] a TTC-nek biológiai hidrogénakceptorként való használatával kapcsolatban csak futólag tettek említést a fény hatásáról, mások viszont [2, 3, 4, 5] alaposabb vizsgálat tárgyává tették a kérdést. Az előbbi szerzők a következő tényekre mutatnak rá:

- A rákos sejtek TTC-vel kezelve csak fényen pirosodnak meg [10].
- Erős fény a tiszta TTC-oldatot piros formazánná (TF) redukálja. A hatás szűrőpapíron fokozottabb mértékű [12].

A TTC fényreakcióit alaposabban tanulmányozó szerzők a következő megállapításokat tették:

Kuhn és munkatársainak vizsgálatai szerint [4, 5] a TTC alkoholos vagy vizes oldatban ibolyántúli fény hatására „foto-TTC”-vé alakul, TF keletkezése mellett:



E diszproporcionálódás során az egyik TTC-molekula TF-á redukálódik, miközben a másik „foto-TTC”-vé oxidálódik. A TF-á való redukcióhoz szükséges 2 hidrogén-atom, a „foto-TTC” keletkezése során szakad le, a másik TTC-molekula 2 és 3 helyzetű fenilcsoportjai közti difenilkötés keletkezése közben [4].

Megállapították továbbá, hogy formazán csak tömény vizes (pl. 1%-os) TTC-oldatból keletkezik fény hatására. Híg vizes és híg vagy koncentrált alkoholos oldatból nem [4].

Részletesen tanulmányozták a fenti reakció kvantumhasznosításának kérdését is és azt találták, hogy az egy kvantum [3].

Megállapították ezenfelül azt is, hogy fenti reakción kívül még más fotokémiai reakciók is megfigyelhetők a fenti vegyületeszerkezettel kapcsolatban: a TF alkoholos oldatban fény hatására fotooxidáció révén TTC-vé alakul; benzolos oldatban ez nem következik be, hanem ehelyett szerintük cis-trans átalakulás kapcsán színváltozással kapcsolatos reverzibilis átrendeződés történik, mely sötétben visszafelé játszódik le [3, 4].

Gierlach és Krebs [2] vizsgálatai szerint a TTC TF-á redukálódik ibolyántúli fény, röntgen- és  $\alpha$ -sugarak hatására. Leghatásosabb a 2536–3650 Å közti hullámhossz-tartomány. A keletkező TF mennyisége egyenesen arányos a fény intenzitásával, a megvilágítás idejével és az indikátor koncentrációjával.  $pH = 5,5$  és  $6,6$  között a redukció mértéke állandó volt.

Atkinson és munkatársai [1] szerint 1%-os TTC oldat fény hatására történő megpirosodását fokozza 20 mg% foszfát hozzáadása; 0,1 mg% riboflavin pedig teljesen megakadályozza. Leghatásosabbnak a kék fény bizonyult. Megvizsgálták fényérzékenység szempontjából a TTC



néhány jódozott származékát is. A 3-p-jodfenil-származék igen csekély fényérzékenységet mutatott, míg a 2,3-di-p-jodfenil és a 2-p-jodfenil-3-p-nitrofenil-származék fény hatására formázán-képződést nem mutatott.

A TTC és származékainak fényreakciói két szempontból bírnak fontossággal: egyrészt elméleti érdekességük, másrészt gyakorlati vonatkozásaik miatt. Jelen vizsgálatok során főleg az utóbbi szempont lebegett szemünk előtt. A TTC biológiai redoxindikátorként, illetve H-akceptorként való használata az utóbbi években világszerte elterjedt. A kapott eredményeket viszont a fény befolyásolhatja s így szükséges a fényreakciók mértékének, lefolyásának, mechanizmusának ismerete ahhoz, hogy elkerülhetők legyenek a fényreakciók által okozott hibák, ill. bizonytalanságok.

Jelen vizsgálataink során választ kívántunk kapni néhány olyan kérdésre, melyet a szakirodalom — tudomásunk szerint — eddig nem tisztázott, a diszproporcionálódási reakcióval kapcsolatban:

1. Miért nem keletkezik TTC-ből TF, alkoholos és híg vizes oldatban?
2. Hogyan befolyásolják a kísérleti feltételek a diszproporcionálódási reakciót?
3. Vizsgálatunk kiterjedt a TTC néhány származékára is.

### Kísérleti rész

#### Vizsgálati módszerek

A fényreakciókat egyenletes minőségű kémcsövekben hajtottuk végre. Az egyenletes minőséget úgy biztosítottuk, hogy a használni kívánt összes kémcsövekben egyidejűleg, azonos TF oldattal elszíntelenedési reakciót játsztattunk le, azonos fényviszonyok mellett. A további vizsgálatokból kizártuk azokat a kémcsöveket, amelyek az átlagtól kiugróan eltérő eredményt adtak (túl gyors, ill. túl lassú színtelenedés). A megmaradt kémcsövek egyéni eltérése az átlagtól  $\pm 5\%$ -on belül volt. Az így kiválogatott kémcsövekkel a további kísérletek úgy folytak, hogy legalább 3–3 párhuzamos kísérletet végeztünk és ezek eredményét átlagoltuk. Ezzel a módszerrel elkerültük a drága és törékeny kvarccsövek használatát. Bár az üveg az ibolyántúli fény nagyrésztét elnyeli, tapasztalatunk szerint kémcsöveink mégis átengedtek annyit, hogy az ilyen fényt kívánó reakciók 1–2 óra alatt teljesen lejátsszódtak.

Fényforrásként általában a nyár délelőtti Nap derült égről reflektált fényét használtuk olyképpen, hogy a reakcióelegyet tartalmazó kémcsősorozatokat a laboratórium nyitott ablakába állítottuk, az épület árnyékos oldalán. Fotométerrel többször ellenőriztük a fényerőt s az kis ingadozásokkal 2500 Luxnak adódott. Miután a fotométerrel kapott érték az összes fény eredő intenzitását adja és semmit sem mond a fény fotokémiaiag hatásos részének intenzitásáról, vizsgálataink nem lépnek fel a precizitás olyan fokú igényével, ami pl. Hauser bonyolult berendezésével [3] elérhető lett volna. (Fényerős monokromátor, kvarcedények, stb.) Mivel az egyes felvetett kérdéseket eldöntő, „összetartozó” kísérleteket mindig egyidőben, tehát azonos fényviszonyok mellett végeztük, a fényforrás bizonytalanságát ezzel kiküszöböltük s így a drága berendezés beszerzését s a velük kapcsolatos nagy többletmunkát elkerültük. Ennek csak az volt az ára, hogy a különböző napokon végzett kísérleti eredmények egymással csak fenntartással hasonlíthatók össze, viszont az egy-egy konkrét kérdést eldöntő kísérletek — mint fentebb említettük — szigorúan azonos körülmények között folytak. Közleményünk további részében úgy járunk el, hogy egy-egy táblázatban, ill. grafikonban csak egyidőben végzett, tehát „összetartozó” kísérletek eredményeit közöljük.

A reakciók során a formazánok mennyiségét a reakcióelegy közvetlen fotometráálásával határoztuk meg átlátszó, nem zavaros oldatok esetében. Vízben lejátsszódo és TF kiválásával kapcsolatos reakció kapcsán a TF-t benzinnel való kirázás után fotometráltuk.

A TTC ill. foto-TTC származékok mennyiségét polarográfiásan állapítottuk meg előző közleményeinkben leírt elvek alapján [6, 7, 9]. A foto-TTC polarográfiás meghatározását a TTC-től eltérő féllépcsőpotenciálja teszi lehetővé.

#### Anyagok és készülékek

A fényreakciókat a TTC illetőleg származékainak\* általában  $10^{-4}$  molos oldatával végeztük. A polarográfiái meghatározásokat Heyrovsky rendszerű, Zbrojovka Brno gyártmányú polarográfával végeztük, normál-kalomel ellenelektrodot használva (Kalousek-edény). A fotometrálás Zeiss gyártmányú Pulfrich fotométerrel történt. A használt vegyszerek pro anal. minőségűek voltak, pufferként Britton—Robinson-féle univerzál puffert alkalmaztunk.

\* A galakto-származékokat és a trifenil-formazánt Mester László, a TTC-t pedig az Arapahoe Chemicals, Inc., Bayer és Lewis Laboratories, Inc., cégek bocsátották rendelkezésünkre; ezért hálás köszönettel tartozunk.



# A végzett kísérletek

1. Először azt a kérdést kívántuk tisztázni, hogy TTC-ből alkoholos és híg vizes oldatban fény hatására miért nem keletkezik formazán. Elgondolásunk szerint ilyen feltételek mellett is kell formazánnak keletkeznie átmenetileg, de ez rögtön tovább alakul foto-oxidáció kapcsán TTC-vé s így „nem ér rá” kicsapódni; töményebb vízoldatban viszont az időegységben keletkező formazán mennyisége nagyobb, mint ami továbbalakulásig túltelített oldatban tudna maradni s ezért a TF egyrésze kicsapódik s ilyen állapotban már kevésbé szenved foto-oxidációt. Alkoholos közegben viszont a TF jól oldódik s így a kicsapódás elmarad az átmenetileg keletkező összes TF tovább alakul TTC-vé.

Elgondolásunk helyességét 3 kísérlettel bizonyítjuk:

a) Következő közleményünk [8] tanúsága szerint a  $TF \rightarrow TTC$  reakció levegő jelenlétében oxigén részvételével történik, a  $2TTC \rightarrow TF + \text{foto-TTC}$  reakció viszont oxigént nem igényel, amint látni fogjuk. Ha tehát TTC-t oxigénmentes térben vetünk alá fényreakciónak, csak a diszproporcionálódási reakció mehet végbe, a keletkező TF pedig ebben a formában megmarad, foto-oxidációt nem szenved. Ilyen körülmények között tehát az eredeti TTC mennyiségnek fele TF-á alakul s mint ilyen, meghatározható. Az erre vonatkozó kísérletek eredményét az 1. ábra mutatja. Látjuk, hogy az eredmények fedik az elképzelést: míg levegő jelenlétében TF kiválás egyáltalában nem volt észlelhető az adott kísérleti feltételek mellett, addig nitrogén-atmoszférában a TTC mennyiség 50%-a TF-á alakul. Így tehát lehetővé vált a két, egymás mellett lejátszódó reakció egyikét „blokkolni” s magát a diszproporcionálódási reakciót tanulmányozni.

Megjegyzendő, hogy az 1. ábra értékeit több párhuzamos kísérlet maximális értékeinek felhasználásával nyertük. Gyakran megtörtént ui., hogy az ábrán megadottaknál sokkal kisebb értékeket kaptunk. Feltehető, hogy ennek oka a következő közleményünkben [8] leírandó „anaerob reakció” esetenkénti fellépése. Ez a zavaró hatás különösen akkor volt erős: ha nem puffertolt oldatban játszottuk le a reakciót. Az anaerob reakció fellépésének mértéke egyébként látszólag öletszerűen változott, azonosnak vélt paralellek esetében is. Nyilván valamely igen érzékeny katalitikus vagy gátló hatás dönti el, hogy az anaerob reakció milyen mértékben játszódhat le.

b) Különböző koncentrációjú vizes TTC-oldatot téve ki fény hatásának, levegő jelenlétében, a keletkező termékek mennyiségét a 2. ábra mutatja. Látjuk ebből, hogy az adott esetben kb.  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M koncentrációig TF kiválás nem észlelhető, s csak ezen koncentrációtól kezdve haladja meg a keletkező TF azt a mennyiséget, ami még túltelített oldatban tud maradni.\*

c) Feltételezésünk helyességét bizonyítja végül az is, hogy a TTC galaktózsármazéka vízoldatban fény hatására nagy koncentrációban sem mutat formazánképződést, mivel a GF vízben a TF-nál sokkal jobban oldódik. (A TF-t vízzel több óráig rázva sem színeződést, sem polarográfiás lépcsőt a vízben nem észleltünk, vagyis gyakorlatilag egyáltalában nem oldódik [ $10^{-6}$  M]). A GF viszont hasonlóképpen eljárva,  $10^{-4}$  M koncentrációban oldódik vízben. Ezért tud a diszproporcionálódáskor keletkező összes GF rögtön tovább oxidálódni.

2. a) A TTC (ill. GTC) diszproporcionálódási reakciójának lefolyását már az 1. kísérlet során leírtuk, ill. közöltük az 1. ábrán. Ebből látható, hogy a reakció időgörbéje exponenciális lefutású.

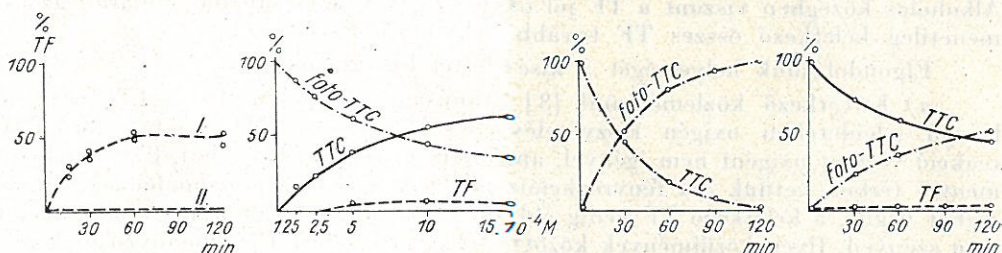
Minthogy a TTC-t a gyakorlatban sokszor aerob körülmények között használjuk, megvizsgáltuk a fényreakció lefutását levegő jelenlétében is: ekkor

\* Kristályosodási góccok (pl.  $CaCO_3$  szuszpenzió, zselatin, stb.) jelenlétében már sokkal kisebb TTC-koncentráció esetében is észlelhető TF-kiválás. Azonos TTC-koncentráció esetében pedig az ilyen góccok jelenléte nagymértékben fokozza a kiváló TF-mennyiséget.



— mint már említettük — nem a diszproporcionálódás menetét látjuk tisztán, hanem a keletkező formazán párhuzamosan lejátszódó fotooxidációja is szerepel a reakció termékei arányának kialakulásában.

A kísérleti eredményeket a 3. ábra mutatja. Ebből látjuk, hogy a formazán az egész reakció folyamán nem mutatható ki. A fénynek kitett oldatoknak sem polarogramjai, sem a színe nem vallottak formazán keletkezésére. A 4. ábrán a reakció lefutása tízszerre töményebb TTC esetén látható. Itt már TF kiválása is észlelhető volt.



1. ábra

2. ábra

3. ábra

4. ábra

1. ábra  $10^{-4}$  M TTC vizes oldatából  $N_2$ -atmoszférában (I), ill. levegő jelenlétében (II) szórt napfény hatására kivált TF mennyisége az eredeti TTC mennyiség %-ában. Az oldat pufferrel  $pH = 7$ -re beállítva. 2. ábra Különböző koncentrációjú TTC vízaloldatában levegő jelenlétében szórt napfényen 2 órai állás után talált reakciótermékek mennyisége az eredeti TTC mennyiség %-ában. Abszcissa: a TTC kezdeti koncentrációja. 3. ábra  $10^{-4}$  M TTC átalakulása vízaloldatban levegő jelenlétében szórt napfényen. 4. ábra  $10^{-3}$  M TTC átalakulása vízaloldatban, levegő jelenlétében szórt napfényen.

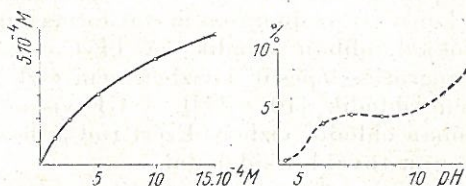
b) A koncentrációnak a diszproporcionálódási reakcióra levegő jelenlétében való hatásának vizsgálatára végzett kísérletek eredményeit a 2. és 5. ábra szemléltetik.

Amint a 2. ábrából látható, a TF kiválása csak  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M-nál koncentráltabb TTC esetében volt észlelhető. A kezdeti TTC-koncentráció növelésével a kiváló TF abszolút mennyisége fokozódik, de határérték felé tart. Hasonlóképpen az átalakult TTC abszolút mennyisége is nő a kezdeti koncentrációval, de a határértéket szemmel láthatólag sokkal magasabb kezdeti TTC-koncentráció esetében éri el, mint a TF kiválás (lásd 5. ábra).

c) Meg kívántuk azt is állapítani, hogy aerob viszonyok között befolyásolja-e az oldat  $pH$ -értéke a TF-kiválás mértékét TTC-ből fény hatására.

A  $pH$  hatását mutató 6. ábrán látható, hogy savas közegben nincs formazánkiválás. Ezután kb.  $pH = 6-10$  a formazánkiválás mértéke gyakorlatilag azonos; ennél lúgosabb közegben ismét emelkedik.

d) A közeg  $pH$ -értékének a diszproporcionálódási reakcióra való hatását tanulmányozva kézenfekvő megoldásnak látszott, a reakció anaerob körülmények



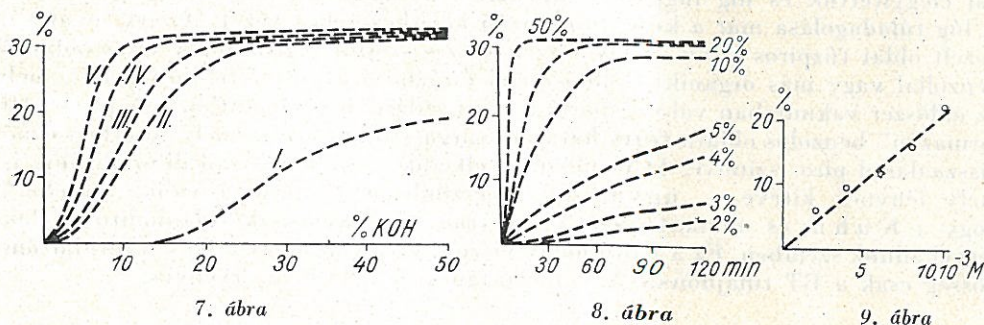
5. ábra

6. ábra

5. ábra. Különböző koncentrációjú vizes TTC oldatban levegő jelenlétében 2 óráig szórt fényen állva, az átalakult TTC abszolút mennyisége ml/l-ben (a 2. ábra adatai alapján). 6. ábra.  $10^{-3}$  M TTC vízaloldatában levegőn, szórt napfényen 1 óra alatt kivált TF mennyisége az oldat  $pH$ -értékének függvényeként (beállítva univerzális pufferrel).



közt való vizsgálata, amikor a TF fotooxidációja nem következik be lényeges mértékben, s a diszproporcionálódás tisztán vizsgálható. Az ennek alapján,  $N_2$ -térben végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy savas közegben ugyancsak nincs TF-kiválás, igazolva, hogy ilyen körülmények között nem formazán, hanem feltehetőleg az 1 és 2 N-atomon redukált szintelen termék keletkezik. A formazánképződés sebességének lúgos közegben várt emelkedése azonban elmaradt és a kapott értékek szabálytalanul ugrálnak a semleges közegben észlelt maximális érték közelében. Ugyanakkor azonban azt is észleltük, hogy a foto-TTC lúgos



7. ábra.  $10^{-2}$  M TTC-ből keletkező TF mennyisége a TTC koncentráció %-ában különböző KOH koncentráció hatására. I:  $20^\circ$ -on 1 óra alatt, II-V:  $70^\circ$ -on  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 és 2 óra alatt.  
8. ábra.  $10^{-2}$  M TTC-ből keletkező TF mennyisége a reakciós idő függvényében, különböző KOH-koncentráció mellett  $70^\circ$ -on (a 7. ábra értékei alapján). 9. ábra. Különböző koncentrációjú TTC-ből  $20^\circ$ -on 2 óra alatt, 50%-os KOH hatására kivált TF mennyisége, a kezdeti TTC-koncentráció %-ában.

közegben  $N_2$ -térben fény hatására, erősen lúgos közegben pedig sötétben is elbomlik, s ez a bomlás fokozódik redukáló anyag (pl. C-vitamin) jelenlétében. Levegő jelenlétében viszont a foto-TTC fényállónak mutatkozott. Joggal feltehető ezek alapján, hogy lúgos közegben a formazánképződés emelkedése azért maradt el, mert a keletkező foto-TTC-vel vagy annak bomlástermékével lép reakcióba a TF keletkezése pillanatában. Ez a körülmény annyira bonyolítja a kérdést, hogy a bekezdés elején kitűzött cél elérésére az anaerob reakció vizsgálata nem látszott alkalmasnak.

e) A lúgos közegnek a diszproporcionálódásra való kedvező hatása alapján feltettük, hogy ilyen erős lúg jelenlétében a reakció fény nélkül is lezajlik. Ennek folytán tanulmányoztuk erős lúg hatását a TTC vizes oldatára. A KOH hatására kiváló TF mennyiségét a KOH és TTC koncentráció, a reakciós idő és a hőfok változtatása mellett a 7. és 8. ábra mutatja. Látjuk, hogy  $20^\circ$ -on csak 12%-osnál töményebb KOH jelenlétében észlelhető TF-kiválás,  $70^\circ$ -on már 2% KOH koncentrációnál is. A 9. ábra szerint a kiváló TF mennyisége arányos a TTC koncentrációjával olyan értelemben, hogy ez az arányosság a formazánnak nem abszolút mennyiségével, hanem a kezdeti TTC mennyiség százalékában kifejezett mennyiségével áll fenn.

Megkíséreltük a reakció lefutása után az oldatban polarográfiásan kimutatni a keletkező foto-TTC-t, mivel ez volna a legerősebb bizonyíték a reakció feltételezett mechanizmusa mellett. Azonban erős lúgban a foto-TTC polarográfiás lépcsőt nem adó terméké bomlik el.

3. Megvizsgáltuk azt is, hogy hogyan viselkedik fény hatására 3,3'-dianizol-bis-4,4'-(3,4-difenil)-tetrazoliumklorid (BT), mely redukálva kék színű formazánt



ad és ezért a biológiai vizsgálatoknál kezd nagymértékben elterjedni. E kérdéssel kapcsolatban csak kevés vizsgálatot kellett végeznünk, mivel már néhány tájékozódó kísérlettel meggyőződünk a következőkről:

a) A BT fényen nem szenved diszproporcionálódást.  
b) Erős lág hatására a BT kék formazán keletkezése mellett diszproporcionálódik.

c) Gyenge redukáló hatással BT-ből előállítottuk a piros vízdoldható „fél-formazán”. Ezt úgy sikerült elérnünk, hogy a BT-t alkoholban oldva C-vitaminnal elegyítettük és híg lúggal cseppenként hozzáadva enyhén meglúgosítottuk. A lág túladdagolása már a kék diformazán keletkezéséhez vezet. Az így, óvatosan kezelt oldat tűzpiros színű, mely vízzel tetszés szerint hígítható. A vizes oldatból benzollal vagy más organikus oldószerrel kirázható a piros „fél-formazán”, mely az oldószer vakuumban való bepárlása után szilárdan is előállítható. A piros „fél-formazán” benzolos oldata fény hatására sárga színűvé válik, mely sötétben ismét visszaalakul piros színűvé. Hasonlóan viselkedik a BT kék színű diformazánja is, mely fénynek kitéve — ugyancsak reverzibilisen — pirossá válik. Feltehető, hogy a K u n és munkatársai [5] cis-trans átalakulásnak tulajdonított jelenséggel állunk szemben. Ez a körülmény viszont arra vall, hogy a fény iránti közömösség csak a BT tulajdonsága, a formazánra ez már nem érvényes.

### Az eredmények megbeszélése

Az 1. kísérlet eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a TTC fény hatására teljes mértékben diszproporcionálódást szenved, vagyis fele formazánna, fele foto-TTC-vé alakul. A keletkező formazán azonban, ha oldatban van (alkoholban vagy híg vizes oldatban) levegő jelenlétében rögtön TTC-vé alakul foto-oxidáció révén. Formazán csak akkor válik ki (az oldat csak akkor pirosodik meg), ha időegységenként több formazán keletkezik, mint amennyi a továbbalakulásig túltelített oldatban tud maradni, vagy pedig anaerob viszonyok közt, amikor a keletkező formazán  $O_2$  hiányában csak lassan tud oxidálódni [8]. Ha a formazán-kiválás elmarad és az átmenetileg keletkező formazán TTC-vé oxidálódik, úgy ez ismét diszproporcionálódik, s így végül a TTC egész mennyisége foto-TTC-vé alakul.

Amint a következő közleményünkben látni fogjuk [8], a formazán foto-oxidációja katalitikus hatások folytán kezdetben igen lassú folyamat: szórt fény mellett kb. fél óráig szinte meg sem indul [8]. Viszont a 3. ábrából látható, hogy a diszproporcionálódási reakció első félórájában a TTC-nek kb. a fele már átalakult, vagyis kb.  $\frac{1}{4}$ -ének még formazán alakjában az oldatban kellene lennie. A kezdetben szintelen oldatnak tehát meg kellene pirosodnia. Hogy ez még sincsen így, az egyrészt azzal magyarázható, hogy a formazán keletkezésével együtt ugyanannyi foto-TTC is képződik, ez viszont katalizálja a TF foto-oxidációját [8]; másrészt bizonyára fokozza ezt a hatást még az a körülmény, hogy a keletkező TF és foto-TTC molekula diszproporcionálódásból származván egymás közvetlen közelébe vannak, s így az utóbbi katalizáló hatása sokkal nagyobb, mint az oldathoz mesterségesen adott foto-TTC-é. Ha viszont a foto-oxidációhoz szükséges  $O_2$  nincsen jelen, — mint láttuk, — a keletkező TF megmarad.

A 2. b) számú kísérletben kapott összefüggések a fotokémia törvényével ellentétben látszanak lenni. Ez u. i. előírja, hogy az átalakult anyagmennyiség abszolút értékének függetlennek kell lennie a kezdeti koncentrációtól.



Az eltérés azzal magyarázható, hogy feltehetőleg a vizsgált legmagasabb kezdeti TTC-koncentráció ( $15 \cdot 10^{-4}$  M) esetén az oldott TTC még nem nyeli el az összes beeső fénykvantumot. Márpedig a fotokémia említett törvénye szerint az átalakult mennyiség nem a beeső, hanem az elnyelt fénykvantumok mennyiségével arányos. A kritikus koncentrációhatár alatt már nem a fény mennyisége a reakció limitáló tényezője, hanem az oldat koncentrációja.

Ehhez hozzájárul még az is, hogy kis kezdeti TTC-koncentrációnál az átmenetileg keletkező TF nagyobb hányada oxidálódik tovább, és kerül el a kiválást, mint nagyobb kezdeti TTC-koncentráció esetén. Ez a formazánkiválás görbéjének anomáliás voltát érthetővé teszi.

Amint egy előző közleményünkben [6] kimutattuk, a TTC redukciója savas közegben nem formazánképződéshez vezet, hanem minél savanyúbb az oldat, annál nagyobb részben egy szintelen vegyület képződik az 1. és 2. N-atomon történő redukció révén. Ennek alapján várható volt, hogy savanyú oldatban kevésbé lesz formazánkiválás észlelhető, TTC-oldatból fény hatására.

A diszproporcionálódás, ill. a formazánkiválás lúgos közegben való fokozódása azzal magyarázható, hogy túlsúlyba jut egy másik hatás: a lúgos közeg a diszproporcionálódás sebességét is fokozza, feltehetően azáltal, hogy csökkenti a TTC aktiválási energiáját. Ennek alapján feltehető volt, hogy erősen lúgos közegben a TTC diszproporcionálódása spontán, tehát fény hatása nélkül is végbemegy, különösen magasabb hőfokon. Mint láttuk, további kísérleteink ezt teljes mértékben igazolják.

A 2. e) kísérletben azt láttuk, hogy az erős lúgban TTC-ből keletkező TF *relatív* mennyisége arányos a kezdeti TTC-koncentrációval, vagyis a diszproporcionálódási reakció ilyen feltételek mellett már nem követi a fotokémiai reakciók törvényét.

Ha feltesszük, hogy diszproporcionálódási reakcióval állunk szemben, akkor a keletkező formazánnak az eredeti TTC-koncentráció 50%-át kellene elérnie, s ehelyett az adott feltételek mellett a TF mennyiségének határértéke a 3. e. sz. kísérletben 30% körül van. Érthetővé válik ez azonban akkor, ha figyelembe vesszük, hogy a TF-kiválással együtt megindul annak egyidejű oxidációja is, éppen úgy, mint a megfelelő fényreakciónál látni fogjuk [8].

Erős lúg hatására a BT, mint láttuk, a TTC-hez hasonlóan formazánkiválás közben diszproporcionálódik, vagyis szintén lecsökken az aktiválási energiája. Úgy látszik azonban, hogy a molekula szerkezete nem alkalmas a fényenergia felvételére. Utalunk e helyen Atkinson [1] és munkatársai már említett vizsgálataira, melyek szerint a szubsztituált TTC-származékok fényérzékenysége a szubsztitúció mértékétől függően csökken. A BT esetében a két fenilgyök kapcsolódása és a két metilcsoport szubsztituens okozza nyilván a fényenergia felvételének megszűnését.

Kísérleti eredményeink alapján a tetrazolium vegyületek használatával kapcsolatban a következő szempontokat szűrhetjük le:

a) Biológiai vagy kémiai anyagok redukáló képességének vizsgálata kapcsán az inkubálás sötétben hajtandó végre, de az utána következő műveleteknél is kerülendő az erős fény. Már 1–2 percig tartó közvetlen napfény-behatás a biológiai vizsgálat eredményét több 100%-kal befolyásolhatja. BT használatával ez az óvatosság fölösleges.

b) Ha a tetrazolium vegyületeket cukrok, C-vitamin, stb. kimutatására (papírkromatogramon) vagy mérésére használjuk, az alkalmazott lúgosság és



melegítés tekintetében óvatosan kell eljárni, hogy spontán formazánképződés elkerülhető legyen. Vakpróba feltétlenül végzendő, ha mennyiségi meghatározásra használjuk a tetrazolium vegyületeket.

Köszönettel tartozom Paul Ilona és Kisbán Klára kartársnőknek buzgó technikai közreműködésükért, valamint Bajusz Eörs kartársnak az erős lúg hatásával kapcsolatos kísérletek elvégzéséért.

### Összefoglalás

Fotometriás és polarográfiás módszerekkel megvizsgáltuk a különböző kísérleti feltételek hatását a TTC és egyes cukorszármazékainak fény hatására bekövetkező diszproporcionálódási reakciójára és a következő megállapításokat tettük:

1. A diszproporcionálódási reakció mindhárom vizsgált vegyületnél formazánná (ill. savas közegben 1,2-dihidro-származékká) és foto-TTC-származékká történik. Formazánkiválás azonban csak olyan feltételek mellett észlelhető, amikor a keletkező formazán kicsapódik, még mielőtt fotooxidációt szenvedne.

2. Anaerob körülmények között a TTC fele TF alakjában kicsapódik, mivel a formazán fotooxidációja csak oxigén jelenlétében gyors.

3. A diszproporcionálódás mértéke az adott feltételek mellett nem független a TTC koncentrációjától. Ennek növelésével nő az időegységenként átalakuló mennyiség, de csak egy határig, azután független a sebesség a koncentrációtól. A fotokémia alaptörvényétől való látszólagos eltérés magyarázatát abban látjuk, hogy a TTC a beeső fénykvantumoknak csak egy részét nyeli el.

4. A diszproporcionálódási reakció sem levegő, sem víz jelenlétét nem igényli. Lúgos kémhatás a sebességet fokozza.

5. Erősen lúgos közegben a fénykatalizálta diszproporcionálódási reakcióval analog reakció sötétben is lefolyik. Az erősen lúgos kémhatás nyilván úgy változtatja meg a molekulaszervezetet, hogy a reakció aktiválási energia nélkül is lefolyhat, vagyis reverzibilitása nő.

6. A TTC-hez hasonlóan a GTC és GTC-acetát is diszproporcionálódik fény hatására, a BT ellenben nem.

Érkezett : 1955. március 1.

### Irodalom

- [1] Atkinson, E., Melon, S. & Fox, S. W. : Science. **111**. 385. 1950.
- [2] Gierlach, Z. S. & Krebs, A. T. : Amer. J. Roentgenol. **62**. 559. 1949.
- [3] Hausser, K. H. : Z. Naturforsch. **5a**. 41. 1950.
- [4] Hausser, I., Jerchel, D. & Kuhn, R. : Ber. **82**. 195. 1949.
- [5] Hausser, J., Jerchel, D. & Kuhn, R. : Ber. **82**. 515. 1949.
- [6] Jámbor, B. : Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **4**. 55. 1954.
- [7] Jámbor, B. : Nature, **173**. 774. 1954.
- [8] Jámbor, B. : Agrokémia és Talajtan. **5**. 99. 1956.
- [9] Jámbor, B. & Mester, L. : Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **6**. 263. 1955.
- [10] Mackenzie, L. M. & Fuller, D. : J. Lab. Clin. Med. **35**. 314. 1950.
- [11] Pechmann, H. & Runge, P. : Ber. **27**. 2920. 11894.
- [12] Stier, A. : Z. Anat. Entw. Gesch. **116**. 399. 1952.



СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ ТЕТРАЗОЛИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
I. РЕАКЦИЯ ДИСПРОПОРЦИОНИРОВАНИЯ

Б. Ямбор

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Этвеша, Будапешт (Венгрия)

## Резюме

При помощи фотометрических и полярографических методов мы изучали влияние различных экспериментальных условий на возникшую под действием света реакцию диспропорционирования ТТХ и его производных сахара, и установили следующее:

1. В процессе реакции диспропорционирования у всех трех исследуемых соединений происходит превращение в формазан (в кислой среде в 1,2-дигидро-производное) и в производное фото-ТТХ. Однако, выпадение формазана наблюдается только при таких условиях, когда образующийся формазан осаждается раньше, чем бы перетерпел фотоокисление.

2. В анаэробных условиях половина ТТХ осаждается в виде ТФ, так как фотоокисление формазана проходит быстро только в присутствии кислорода.

3. Степень диспропорционирования при данных условиях зависит от концентрации ТТХ. По мере увеличения концентрации ТТХ до известного предела возрастает количество превращающегося в единицу времени вещества, а затем скорость превращения не зависит от концентрации. Это кажущееся расхождение от основного закона фотохимии, по нашему мнению объясняется тем, что ТТХ поглощает только одну часть падающих световых квантов.

4. Реакция диспропорционирования не требует ни присутствия воздуха, ни присутствия воды. Щелочная среда ускоряет реакцию.

5. В сильно щелочной среде реакция, аналогичная катализуемой светом реакции диспропорционирования, происходит и в темноте. Сильно щелочная среда повидимому изменяет строение молекулы таким образом, что реакция может произойти и без энергии активирования, т. е. усиливается ее обратимость.

6. Аналогично ТТХ, под действием света диспропорционируются ГТХ и ацетат ГТХ, но БТ нет.

*Рисунок 1:* Количество ТФ, выделившегося из  $10^{-4}$  М водного раствора ТТХ в азотистой атмосфере (I) и в присутствии воздуха (II) под действием рассеянного солнечного света (в %-ах от исходного количества ТТХ). Реакция раствора при помощи буфера доведена до pH = 7.

*Рисунок 2:* Количество реакционных продуктов, найденных в водных растворах ТТХ различной концентрации после 2 часового стояния на рассеянном солнечном свете в присутствии воздуха (в %-ах от исходного количества ТТХ). Абсцисса: исходная концентрация ТТХ.

*Рисунок 3:* Превращение  $10^{-3}$  М водного раствора ТТХ в присутствии воздуха, на рассеянном солнечном свете.

*Рисунок 4:* Превращение  $10^{-3}$  М водного раствора ТТХ в присутствии воздуха, на рассеянном солнечном свете.

*Рисунок 5:* Абсолютное количество ТТХ, перетерпевшего превращение после 2 часового стояния водных растворов ТТХ различной концентрации в присутствии воздуха на рассеянном солнечном свете (на основании данных рисунка 2.).

*Рисунок 6:* Количество ТФ, выделившегося из  $10^{-3}$  М водного раствора ТТХ после 1 часового стояния в присутствии воздуха на рассеянном солнечном свете, в зависимости от величины pH раствора (величина pH устанавливалась помощью универсального буфера).

*Рисунок 7:* Количество ТФ, образовавшегося из  $10^{-2}$  М ТТХ под действием КОН различной концентрации. I: при температуре в  $20^{\circ}$  за 1 час; II–V: при температуре в  $70^{\circ}$  за 1/4, 1/2, 1 и 2 часа (в %-ах от концентрации ТТХ).

*Рисунок 8:* Количество ТФ, образовавшегося из  $10^{-2}$  М ТТХ в зависимости от реакционного времени, при различной концентрации КОН и температуре в  $70^{\circ}$  (на основании данных рисунка 7).

*Рисунок 9:* Количество ТФ, выделившегося из ТТХ различной концентрации при температуре в  $20^{\circ}$  в течение 2 часов, под действием 50%-го КОН (в процентах от исходной концентрации ТТХ).



## Die Lichtreaktionen der Tetrazoliumverbindungen

### I. Disproportionierungs Reaktion

B. J. ÁMBOR

Pflanzenphysiologisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest (Ungarn)

#### Zusammenfassung

Wir haben mit photometrischen und polarographischen Methoden die Wirkung der verschiedenen Versuchsbedingungen auf die, bei den TTC und einzelnen seiner Zuckerderivate, als Folge der Einwirkung des Lichtes sich abspielende Disproportionierungs Reaktion geprüft und folgendes fest gestellt:

1. Die Disproportionierungsreaktion geschieht bei sämtlichen drei geprüften Verbindungen zu Formazan (bzw. in saurehaltigem Medium 1,2-Dihydro-Derivat) und zu Photo-TTC-Derivat. Formazanausscheidung ist jedoch nur unter der Bedingung wahrnehmbar, wenn der entstehende Formazan einen Niederschlag bildet, noch bevor er Photooxydation erleidet.
2. Unter anaeroben Umständen erfährt die Hälfte des TTC in Form von TF eine Fällung, nachdem die Photooxydation des Formazans nur bei Vorhandensein von Oxygen schnell vor sich geht.
3. Das Mass der Disproportionisierung ist unter den gegebenen Umständen nicht unabhängig von der Konzentration des TTC. Mit dessen Vermehrung wächst das je Zeiteinheit sich umändernde Quantum, jedoch nur bis zu einer Grenze, später ist die Geschwindigkeit unabhängig von der Konzentration. Die scheinbare Abweichung von dem Grundgesetze der Photochemie können wir damit erklären, dass das TTC bloss einen Teil der hereinfallenden Lichtmengen absorbiert.
4. Die Disproportionierungs-Reaktion beansprucht weder die Anwesenheit von Luft noch von Wasser. Alkalische Reaktion steigert die Geschwindigkeit.
5. In stark alkalischem Medium geht eine mit der lichtkatalysierten Disproportionierungs-Reaktion analoge Reaktion auch im Finstern vor sich. Die stark alkalische Reaktion verändert offenbar auf die Weise die Molekül-Struktur, dass die Reaktion auch ohne aktivierungs-Energie erfolgen kann, das heisst ihre Reversibilität nimmt zu.
6. Gleich dem TTC disproportioniert auch das GTC und GTC-Acetat auf Einwirkung des Lichtes, das BT hingegen nicht.

Abb. 1. Aus  $10^{-4}$  M TTC (wässrige Lösung) in  $N_2$  Atmosphäre (I), bzw. in Gegenwart von Luft (II) auf Einwirkung von diffusum Sonnenlicht ausgeschiedene Formazanmenge als % des originalen TTC Quantums. Die Lösung ist mit Puffer auf  $p_H = 7$  eingestellt.

Abb. 2. In wässriger Lösung von TTC verschiedener Konzentration nach 2 stündigem Stehen an diffusum Sonnenlicht gefundene Quantität von Reaktionsprodukten im % der Anfangskonzentration an TTC. Abscisse: die Anfangskonzentration des TTC.

Abb. 3. Die Umwandlung von  $10^{-4}$  M TTC im Wasserlösung an diffusum Sonnenlicht in Anwesenheit von Luft.

Abb. 4. Die Umwandlung von  $10^{-3}$  M TTC im Wasserlösung, in Anwesenheit von Luft, an diffusum Sonnenlicht.

Abb. 5. In wässriger TTC Lösung von verschiedener Konzentration (in Anwesenheit von Luft 2 Stunden hindurch an diffusum Lichte stehend), gefundene absolute Menge von umgeändertem TTC in mol/l auf Grund der Daten der Abbildung 2.

Abb. 6. Aus Wasserlösung von  $10^{-3}$  M TTC an der Luft, an diffusum Sonnenlicht innerhalb 1 Stunde ausgeschiedene TF Menge, als Funktion des  $p_H$ -Wertes der Lösung (eingestellt mit Universalpuffer).

Abb. 7. Aus  $10^{-2}$  M TTC entstehende TF Menge als % der TTC Konzentration auf Einwirkung von verschiedenen KOH Konzentrationen. I:  $20^\circ$  während einer Stunde. II–V:  $70^\circ$  während  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 und 2 Stunden.

Abb. 8. Die aus  $10^{-2}$  M TTC entstandene TF Menge als Funktion der Reaktionszeit, bei verschiedenen KOH-Konzentrationen bei  $70^\circ$ . (Auf Grund der Werte der Abbildung 7).

Abb. 9. Aus TTC verschiedener Konzentration bei  $20^\circ$  während 2 Stunden, auf Einwirkung von 50%-igem KOH ausgeschiedene Menge TF, als % der anfänglichen TTC-Konzentration.